



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**ROZŠÍŘENÍ TISKOVÉ HLAVY PRO 3D TISK
TERMOLABILNÍCH HYDROGELŮ**

UPGRADE OF EXTRUDER HEAD FOR 3D BIOPRINTING OF THERMOLABILE HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kryštof Kedroň

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

BRNO 2019

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Kryštof Kedroň

ID: 195722

Ročník: 3

Akademický rok: 2018/19

NÁZEV TÉMATU:

Rozšíření tiskové hlavy pro 3D tisk termolabilních hydrogelů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši dostupných modulů 3D tisku se zaměřením na extruzi hydrogelů s termolabilními vlastnostmi. 2) Navrhněte optimální vybavení pro tisk 3D struktur včetně řízení teploty. 3) Navrhněte a realizujte pomocí 3D tisku vhodnou tiskovou hlavu pro extruzi více hydrogelů v jedné úloze. 4) Navrhněte a realizujte také elektronickou část pro ovládání tiskové hlavy. 5) Proveďte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ATALA Anthony, YOO J. James. Essentials of 3D biofabrication and translation. 1st ed. Academic Press, 2015. ISBN 978-0128009727.

[2] CANESSA Enrique, FONDA Carlo, ZENNARO Marco. Low-cost 3D Printing for Science, Education and Sustainable Development. 1st ed. ICTP, 2013. ISBN 92-95003-48-9.

Termín zadání: 4.2.2019

Termín odevzdání: 24.5.2019

Vedoucí práce: Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

3D biotisk je perspektivní metoda tkáňového inženýrství, schopná vytvářet tkáňové struktury s fyziologickou funkcí a prostorovým uspořádáním. Tato práce se zabývá využitím této metody pro tisk termolabilních hydrogelů. Hlavním cílem práce je rozšíření tiskové hlavy pro 3D tisk termolabilních hydrogelů. Teoretická část se věnuje popisu 3D biotisku, zejména pak důležitým vlastnostem které musí každý materiál splňovat aby byl tisku schopný, dále je zde uvedena rešerše používaných hydrogelů v biotisku, se zaměřením na termolabilní, tiskových modalit, možností chlazení tiskové hlavy a popis návrhu ideálního vybavení pro tisk termolabilních hydrogelů. Praktická část se věnuje návrhu a realizaci tiskové hlavy pro 3D tisk termolabilních hydrogelů, v poslední části jsou vyhodnoceny a diskutovány dosažené výsledky.

Klíčová slova

3D biotisk, hydrogel, teplotní regulace, pneumatická extruze.

Abstract

3D bioprinting is a perspective method of tissue engineering, capable of creating tissue structures with physiological function and spatial arrangement. The thesis deals with the use of this method for printing thermolabile hydrogels. The main goal of the thesis is to extend the print head for 3D printing of thermolabile hydrogels. The theoretical part is devoted to the description of 3D bioprinting, especially the important properties that each material must meet to be able to print, there is also a review of used hydrogels in bioprinting, focusing on thermolabile, print modalities, the possibility of cooling the printhead and a description of the ideal equipment for printing of thermolabile hydrogels. The practical part deals with the design and realization of the print head for 3D printing of thermolabile hydrogels, in the last part the achieved results are evaluated and discussed.

Keywords

3D bioprinting, hydrogel, thermal regulation, pneumatic extrusion.

Bibliografická citace:

KEDROŇ, K. *Rozšíření tiskové hlavy pro 3D tisk termolabilních hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2019. 18 s. Vedoucí semestrální práce Ing. Josef Jaroš, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma „Rozšíření tiskové hlavy pro 3D tisk termolabilních hydrogelů“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Josefu Jarošovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Richardu Hegerovi za podnětné rady.

V Brně dne

.....

podpis autora

Obsah

Úvod	9
1 Teoretická část studentské práce	10
1.1 Vlastnosti biomateriálů pro 3D biotisk	10
1.1.1 Fyzikální vlastnosti	10
1.1.2 Biologické vlastnosti	11
1.2 Hydrogely pro 3D biotisk	12
1.2.1 Přírodní hydrogely	12
1.2.2 Syntetické hydrogely	14
1.3 3D Biotisk a jeho modality	14
1.3.1 Inkjet biotisk	15
1.3.2 Biotisk založený na laseru	16
1.3.3 Extruzivní biotisk	17
1.4 Možnosti chlazení tiskové hlavy	18
1.4.1 Přímé chlazení tiskové hlavy	19
1.4.2 Nepřímé chlazení tiskové hlavy	20
1.5 Vybavení pro 3D biotisk termolabilních hydrogelů	20
1.5.1 Extruzivní biotisk	20
1.5.2 Systém extruze	21
1.5.3 Platforma biotisku	21
1.5.4 Inkubátor biotisku	21
1.5.5 Chlazení tiskové hlavy	21
1.6 Cíle práce	21
2 Praktická část studenstské práce	23
2.1 Insert tiskové hlavy	23
2.2 Chladicí okruh	24
2.2.1 Elektronická část chladicího okruhu	25
2.2.2 Program pro řízení teploty	28
2.2.3 3D modely	29
2.2.4 Výsledek chlazení	32
2.3 Tisk více hydrogelů v jedné úloze	33
2.4 Diskuze	34
3 Závěr	35

Seznam obrázků

Obr. 1.1: A) Tepelný injket biotisk, B) Piezoelektrický injekt biotisk [15]	15
Obr. 1.2: Laserem vedený biotisk [15]	16
Obr. 1.3: Laserem-asistovaný biotisk [15]	17
Obr. 1.4: A) Pneumatická extruze, B) Pístová extruze, C) Šroubová extruze [15] ...	18
Obr. 2.1: A) Insert pro hadičku s vnějším průměrem 1,98 mm, B) Insert pro hadičku s vnějším průměrem 1,27 mm	24
Obr. 2.2: Chladicí okruh	25
Obr. 2.3: Step-down DC/DC měnič	26
Obr. 2.4: Schéma zapojení pro řízení teploty	27
Obr. 2.5: Modul Screw Shield 1.0	27
Obr. 2.6: První stupeň menu	28
Obr. 2.7: Druhý stupeň menu.....	28
Obr. 2.8: Třetí stupeň menu	29
Obr. 2.9: Čtvrtý stupeň	29
Obr. 2.10: Kryt chladících bloků	30
Obr. 2.11: První část skřínky na elektroniku.....	31
Obr. 2.12: Druhá část skřínky na elektroniku	31
Obr. 2.13: Redukce hadic.....	32
Obr. 2.14: Průběh ochlazování chladícího média při plném výkonu	32
Obr. 2.15: Průběh ochlazování chladícího média při nastavení 3 °C.....	33
Obr. 2.16: Detail tiskové hlavy GeSim–BioScaffolder	34

ÚVOD

V posledních desetiletích se výroba tkání stala běžnou součástí tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Nicméně klasické techniky tvoření tkání, jako je scaffolding, microengineering nebo buněčné inženýrství jsou omezeny svou schopností vyrábět komplexní tkáňové struktury s požadovanou přesností a kontrolovatelností, která je potřebná pro replikaci biologicky relevantních tkání. Alternativou k těmto technikám tvoření tkání je 3D biotisk.

3D biotisk umožňuje přesnou kontrolu složení, prostorové distribuce a architektury výsledných konstruktů usnadňujících rekapitulaci jemných tvarů a struktur cílových orgánů a tkání. Jedná se o velice perspektivní metodu, která si dává za cíl mimo jiné vyřešení problému způsobeného nedostatečným množstvím dárcovských orgánů. Jelikož se jedná o progresivní metodu je v této problematice zaangažováno čím dále více firem zaměřujících se na výrobu tiskáren a biomateriálů.

V současné době je většina komerčně vyráběných tiskáren uzpůsobena pro tisk hydrogelů při laboratorní teplotě nebo teplotách vyšších a většina tiskáren nedokáže regulovat teplotu pod teplotu okolí. Takováto regulace teploty je složitá a nutí si použití speciální aparatury.

V teoretické části této práce se zaměřuji na popis dnes nejpoužívanějších materiálů pro 3D biotisk, s důrazem na termosenzitivní hydrogely, tiskových modalit, možností chlazení tiskové hlavy a návrhu optimálního vybavení pro 3D biotisk termolabilních hydrogelů.

Praktická část práce se věnuje realizaci chladicí jednotky pro tisk termolabilních hydrogelů. Tato chladicí jednotka se sestává z insertu tiskové hlavy a vlastního chladicího okruhu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vlastnosti biomateriálů pro 3D biotisk

Každý biomateriál musí vykazovat charakteristické vlastnosti, aby mohl být tisknut v dostatečném rozlišení, tisk byl reprodukovatelný a výsledná struktura plnila požadovanou funkci. Tyto vlastnosti jsou podobné pro všechny biomateriály, ovšem já se omezím pouze na popis hydrogelů, protože ty jsou pro biotisk využívány nejčastěji. Tyto vlastnosti se dají rozdělit na dvě skupiny podle jejich původu: fyzikální a biologické.

1.1.1 Fyzikální vlastnosti

Hlavní vlastností biomateriálů je viskozita. Viskozita je veličina charakterizující odpor proudění, když je na materiál aplikována síla, [1]. Ideální viskozita během přípravy biomateriálů a během tisku by měla být co nejnižší. Nízká viskozita během přípravy biomateriálů zajistí kvalitní rozmíchání buněk v roztoku a tím i rovnoměrné hustoty buněk v celém preparátu. Během tisku nízká viskozita materiálu zamezí vysokým hodnotám smykového napětí, které by mohlo mít špatný vliv na buňky a vést až k buněčné smrti. Na druhou stranu po vytisknutí biomateriálu by měla být viskozita dostatečně vysoká, aby nebylo ovlivněno rozlišení výtisku výsledného produktu roztečením. Podle toho, zda jdou kapaliny popsat Newtonovským zákonem viskozity, lze rozdělit kapaliny na Newtonovské a Nenevtonovské. Při pohledu na rovnici (1.1),

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} \quad (1.1)$$

kde τ je tečné napětí, u je rychlost toku, x souřadnice v kolmém směru na směr proudění a η je dynamická viskozita, lze odvodit, že biomateriál musí být Nenevtonovského typu. Takovouto kapalinou, splňující požadované podmínky, je kapalina s pseudoplastickým charakterem. Jedná se o kapaliny, u kterých viskozita klesá společně s rostoucím smykovým napětím. Tím je zajištěno nižších hodnot viskozity během tisku a jejího nárustu po vytisknutí materiálu.

Další důležitou vlastností je celková tuhost biomateriálu, a to zejména po vytisknutí. Tuto tuhost můžeme charakterizovat Youngovým modelem, jenž je charakterizován jako poměr napětí a jím vyvolané deformace. Čím je modul vyšší, tím je materiál tužší a hůře deformovatelný tlakem. Tuhost materiálu lze regulovat jeho stupněm síťování, přičemž výsledná tuhost by měla být co nejvíce podobná fyziologické tuhosti tkáně, kterou chceme tisknout, [2].

Jak již bylo zmíněno, tuhost produktu je přímo ovlivněná síťováním po tisku. Jelikož výsledná tuhost má za následek správnou funkci tkáně, je síťování

nezanedbatelnou vlastností materiálu. Metody síťování se dělí na fyzikální a chemické. Nejčastěji se využívá síťování pomocí teploty. Zvýšení teploty způsobí konformační změny a produkt začne síťovat. Teplota při které látka síťuje se nazývá Critical solution temperature (CST), typ hydrogelu přímo ovlivňuje tuto hraniční teplotu. Například želatina má CST okolo 30 °C, což znamená, že při teplotě vyšší než 30 °C je rozpustný roztok, ale při teplotách nižších než 30 °C je nerozpustný gel, [3]. Mezi další termosenzitivní hydrogely patří kolagen I, agaróza a Pluronic. Dále lze síťování vyvolat ionizací, fotoiniciací nebo enzymaticky. Při všech těchto metodách je nutné dbát na to, aby nepoškozovaly buňky.

V poslední řadě je nutné regulovat teplotu. Teplota nejen ovlivňuje síťování hydrogelů, ale také působí na viskozitu. Teplotu je nutné volit v určitém rozmezí a nevystavovat buňky teplotnímu stresu. Teplotní stres se projeví zejména pokud jsou buňky vystavené vysoké teplotě po delší časový úsek, například při injekt biotisku s tepelným systémem jsou buňky vystavené extrémním teplotám (300 °C) pouze velmi krátký časový úsek (~2 μs) a tím pádem nemají vliv na viabilitu buněk, [4].

1.1.2 Biologické vlastnosti

Jedna ze základních biologických vlastností je biokompatibilita. Biokompatibilitu lze definovat jako schopnost biomateriálu vykonávat požadovanou funkci s respektem k lékařské terapii, bez vyvolání jakýchkoliv nežádoucích účinků jak lokálních, tak systémových u příjemce, zároveň je požadováno, aby biomateriál vytvářel co nejvíce odpovídající buněčnou a tkáňovou odpověď na specifickou situaci a optimalizoval příslušnou terapii, [5].

Jelikož hydrogel plní funkci opory buněk, musí být cytokompatibilní a imunogenní. Dále všechny produkty vznikající degradací hydrogelů musejí být metabolizovatelné za standardních podmínek (teplota, pH, obsah iontů), [6].

Další vlastností je biodegradční kinetika. Hydrogely, stejně jako extracelulární matrix (ECM), jsou schopné degradace a přetváření. Je důležité, aby tato degradace probíhala stejnou rychlostí, jakou buňky vytváří ECM. Pokud by degradace probíhala moc pomalu, mohla by struktura polymeru narušit správný vývoj tkáně a limitovat přísun živin nebo kyslíku k buňkám. Na druhou stranu, pokud by degradace byla příliš rychlá a buňky by nestíhaly vytvářet ECM tak by celá struktura byla mechanicky nestabilní a ztratila svůj tvar, čímž by byl narušen celý požadovaný vývoj tkáně, společně s její funkcí.

V lidském těle jsou 4 typy tkání, přičemž každá má jinou histologickou strukturu, která odpovídá její funkci. Tato struktura musí být dodržena, jak prostorové uspořádání, tak rozložení buněk a ECM. Takovéto napodobování struktury tkání nazýváme biomimicry, [6].

Mimo struktury je také důležité, aby hydrogel měl co nejvíce podobné mechanické vlastnosti požadované tkáň, ve smyslu její tuhosti. Zároveň je ale nutné myslet na to, aby hydrogel vytvářel potřebnou podporu pro buňky a po natisknutí struktura neměnila tvar.

1.2 Hydrogely pro 3D biotisk

Hydrogely jsou hydratované polymerní struktury využívané v tkáňovém inženýrství. Hlavní výhodou je strukturní podobnost s ECM a s tím spojená biokompatibilita. Také splňují všechny fyzikální vlastnosti, které musí biomateriál mít, aby byl tisku schopný. Výroba hydrogelů není některak složitá nebo drahá, navíc jejich variabilita umožňuje použití pro široké spektrum tkání. Dají se rozdělit podle původu na přírodní a syntetické.

1.2.1 Přírodní hydrogely

Přírodní hydrogely jednoduše degradují a metabolizují in vivo. Nevýhodou těchto hydrogelů jsou špatné mechanické vlastnosti, potenciální rejekce a v některých případech, příliš rychlá degradace.

Kolagen

Kolagen je protein nejhojněji zastoupený v lidském těle (25%). Ze všech typů kolagenu je kolagen typu I převládající (90%), [7]. Patří mezi hlavní komponenty ECM a proto je ideálním biomateriálem pro tkáňové inženýrství, potažmo biotisk. Jako všechny přírodní hydrogely jsou i kolagenní hydrogely biokompatibilní, navíc jejich imunogenicita je oproti ostatním přírodním hydrogelům celkem nízká. Vzhledem k velkému počtu míst schopných adheze buněk a enzymaticky aktivním místům ve struktuře kolagenu I, jsou buňky schopny v tomto hydrogelu rychle remodelovat matrix. Limitací těchto hydrogelů je tvarová věrnost, mechanická pevnost a pomalá rychlost síťování. Některé tyto limitace, jako je například rychlost síťování, lze odstranit smícháním kolagenního hydrogelu s jiným typem hydrogelu. Jelikož jsou kolagenní hydrogely termosenzitivní a pH-senzitivní, musejí se uchovávat ve speciálním kyselém prostředí, ve kterém je teplota regulována na 4 °C, tuto teplotu a pH je nutné udržovat, aby hydrogel samovolně nevytvářel kovaletní vazby a nesíťoval, již před tiskem nebo během něj.

Kvůli výše zmíněným výhodám jsou kolagenní hydrogely dnes nejpoužívanějším typem v tkáňovém inženýrství. Navíc je jejich použití jednoduché (pro síťování stačí pouze zvýšit teplotu nebo změnit pH prostředí), mají relativně dlouhou životnost a dají se jednoduše připravit za nízkou cenu, [6].

Želatina

Želatina je denaturována, částečně hydrolyzovaná, forma kolagenu I. Jelikož je želatina derivací kolagenu I, má podobné vlastnosti. Sítování hydrogelu probíhá za pokojových teplot. Želatina teplotu tání nižší, než je fyziologická teplota (27-33 °C, v závislosti na koncentraci), a její použití in vivo je nemožné. Chemickou úpravou nebo smícháním s jiným polymerem je možno tuto překážku překonat. I přes její nestabilitu při fyziologické teplotě, má želatina své využití v 3D biotisku, ovšem spíše jako příměs hydrogelu, než jako primární složka, [8].

Fibrin

Fibrin jako protein je základním kamenem při tvorbě sraženin v lidském těle. V tkáňovém inženýrství jde o jeden z nejpoužívanějších proteinů [9], ovšem jeho použití v 3D biotisku je značně omezené a to hlavně kvůli jeho špatným mechanickým vlastnostem a krátkému degradačním čase. Stejně jako želatina je spíše používán jako přísada biomateriálů.

Matrigel

Matrigel je komerční název pro mezibuněčnou hmotu, který produkují buňky sarkomu myši rodu Engelbreth-Holm-Swarm, [10]. Jeho největší výhodou je podpora růstu buněk a schopnost diferencovat v široké spektrum buněčných linií. Další výhodou je schopnost vytvářet mechanicky pevné struktury s vyšší viabilitou buněk, než je tomu při použití jiných hydrogelů. Matrigel má podobné termosenzitivní vlastnosti jako kolagen I a sítuje při teplotách v rozmezí 24 až 37 °C. Po výrobě je nutné jej uchovávat při teplotě 4 °C kvůli tomu, aby samovolně nesítval. Jedna z možností využití tohoto gelu při biotisku je vytvoření tenké souvislé vrstvy, na kterou jsou dále sázeny jednotlivé buňky, a to buď injekt biotiskem nebo některou z metod založené na laseru [6], obě tyto metody jsou dále popsány. Takto vytvořené struktury jsou však pouze v jedné vrstvě a tvorba složitých 3D struktur není možná. Druhá možnost je tisknout hydrogel a v něm rozmíchané buňky, při této technologii je však nutné biomateriál během celého tisku ochlazovat, [11]. Nejvhodnější modalita pro tento tisk je extruzivní, jejíž hlavní výhody jsou popsány níže.

Kvůli výborným biologickým vlastnostem a aplikaci pro široké spektrum buněčných linií je Matrigel jeden z nejpoužívanějších biomateriálů. Ovšem pracovat s ním v 3D biotisku je třeba při nízkých teplotách a kvalita tisku se odvíjí také od schopnosti regulovat teploty během tisku a po něm.

1.2.2 Syntetické hydrogely

Syntetické hydrogely mohou být modifikovány, tak aby tyto nevýhody neměli. Ovšem jejich hlavní nevýhodou zůstává inertnost a špatná biologická degradace in vivo.

Poly(ethylen glycol)

Poly(ethylen glycol), zkráceně PEG, je jeden z nejpoužívanějších syntetických hydrogelů a to hlavně kvůli jeho biokompatibilitě a možnosti jej chemicky modifikovat navázáním různých funkčních skupin. Takovouto modifikací lze měnit jeho bioaktivitu nebo mechanické vlastnosti. Sítování u těchto hydrogelů lze velice jednoduše vyvolat fotoiniciací. Díky této vlastnosti se dají tisknout 3D struktury bez toho, aniž by ztrácely své prostorové rozlišení. Přes tyto výhody je jeho využití pouze omezené, a to zejména kvůli jeho biologické inertnosti, která neumožňuje buněčnou adhezi, proto je nezbytné tento materiál synteticky modifikovat, [6].

Pluronic F-127

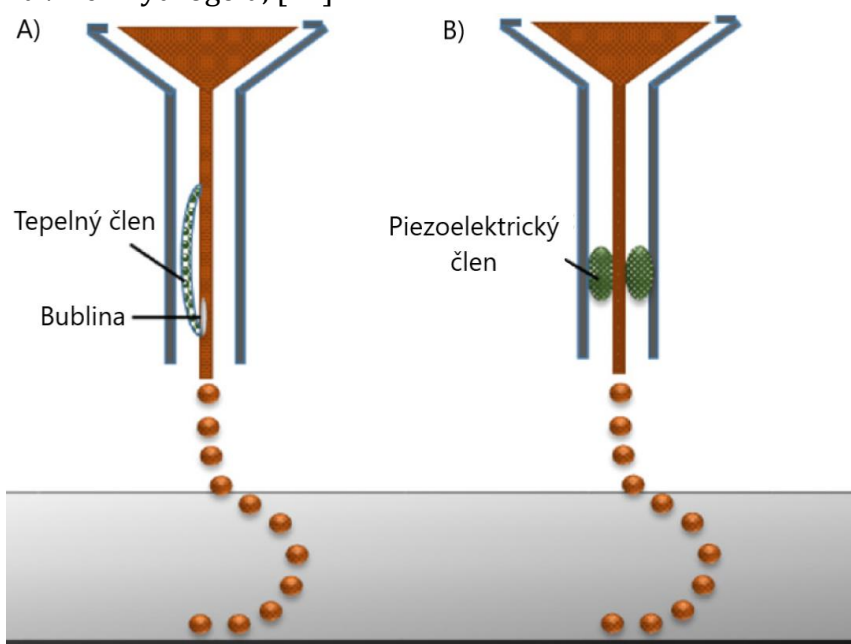
Pluronic je komerční název pro termolabilní poloxamer. Stejně jako PEG je možné jej chemicky upravovat a tím i upravovat jeho vlastnosti. Sítuje v rozmezí teplot 10 až 40 °C, přičemž záleží na jeho chemické úpravě. Největší výhodou těchto hydrogelů je nízká toxicita, sítování během fyziologických teplot a možnost regulace viskozit, úpravou jejich chemického složení. Nevýhody jsou stejné jako u PEG, plus buňky přežívají v tomto hydrogelu pouze omezený čas. Tento hydrogel se využívá zejména v experimentálních fázích biotisku zatím neotestovaných látek, kdy po omezenou dobu je schopný vytvářet kvalitní prostředí pro buňky, [12].

1.3 3D Biotisk a jeho modality

3D biotisk je metoda založena na klasickém tisku, respektive 3D tisku, kde je materiál umisťován na přesná místa a postupně se vytváří požadovaná struktura. Rozdíl oproti klasickému tisku je v použitém materiálu, kterými jsou biomateriály (nejčastěji hydrogely), buďto obsahující zapouzdřené buňky nebo se buňkami výsledný produkt osází až po tisku. Ve většině případů počítač ovládá platformu, schopnou pohybu ve třech osách, která se pohybuje po uživatelem zadaných souřadnicích, uložených například v g-kódu, který může tiskárna následovat, na níž se extruduje biomateriál, tak aby výsledná struktura produktu byla co nejvíce podobná navržené. Při biotisku tkání jsou navrhované struktury stejné jako fyziologické struktury. Podle typu použité technologie můžeme biotisk rozdělit na několik kategorií: injekt, založené na laseru a extruzivní.

1.3.1 Inkjet biotisk

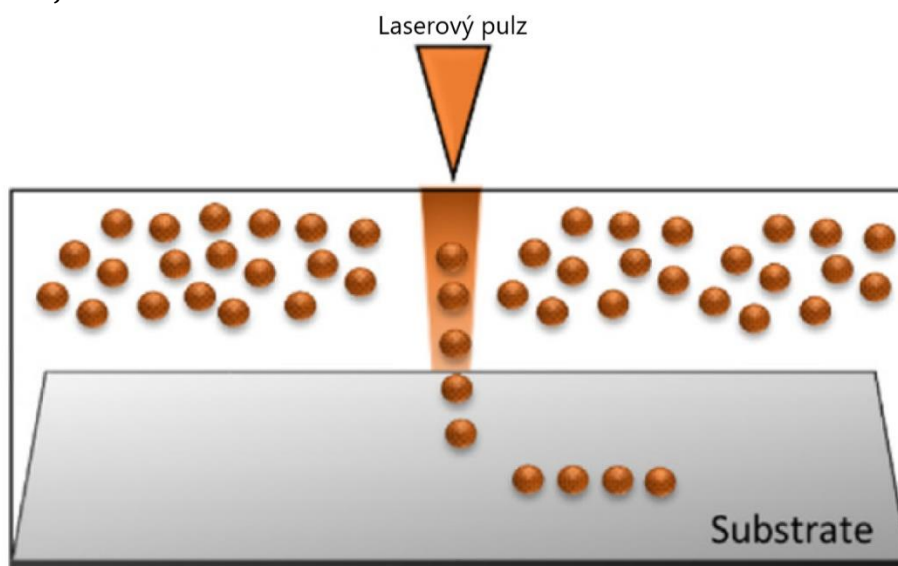
Tento typ biotisku vychází z technologie používané v klasických inkoustových tiskárnách. Biomateriál je obdobně jako u inkoustové tiskárny nanášen kapku po kapce na předem, uživatelem určená, místa. Na základě technologie, pomocí které se vytváří jednotlivé kapky lze inkjet biotisk rozdělit na piezoelektrický a tepelný. Při piezoelektrickém inkjet biotisku se kapka vytváří pomocí piezoelektrického členu umístěného na konci trysky, který při přiložení napětí změní svůj tvar a vytlačí kapku na tiskovou podložku. Zatímco tepelný inkjet využívá tepelný člen, tento člen se velice rychle zahřeje na vysokou teplotu a odpařováním vznikne bublina, která kapku vytlačí, protože tento typ biotisku pracuje s vysokými teplotami, je pro termosenzitivní hydrogely zcela nevyužitelný. Mezi hlavní přednosti inkjet biotisku patří rychlost tisku, vysoké rozlišení ($50\text{ }\mu\text{m}$ [13]) a nízká cena tisku. Největší nevýhodou u tohoto typu tisku je ucpávání trysky, nízká hustota buněk, vysychání buněk během tisku a limitující konstrukční schopnosti ve 3D strukturách, jestliže není jako biomateriál zvolen hydrogel s dostatečně rychlou polymerizací. Nedávno byly vyvinuty další technologie pro vytváření jednotlivých kapek, které odstraňují některé předešlé nevýhody. První z nich jsou tiskárny založené na ventilu, který přesně dávkuje biomateriál. Tento typ inkjet biotiskáren vytváří struktury hustěji osázené buňkami, jednotlivé natisknuté kapky méně vysychají a tryska se ucpává méně. Na druhou stranu jsou tyto tiskárny schopny tisknout pouze biomateriály o viskozitách menších než 200 mPa s . Další jsou tiskárny, které biomateriál vytlačí pomocí akustických vln, tato technologie zcela odstraňuje ucpávání trysky, ovšem teplo které je v průběhu tisku vytvářeno zcela znemožňuje použití při tisku termosenzitivních hydrogelů, [14].



Obr. 1.1: A) Tepelný inkjet biotisk, B) Piezoelektrický inkjet biotisk [15]

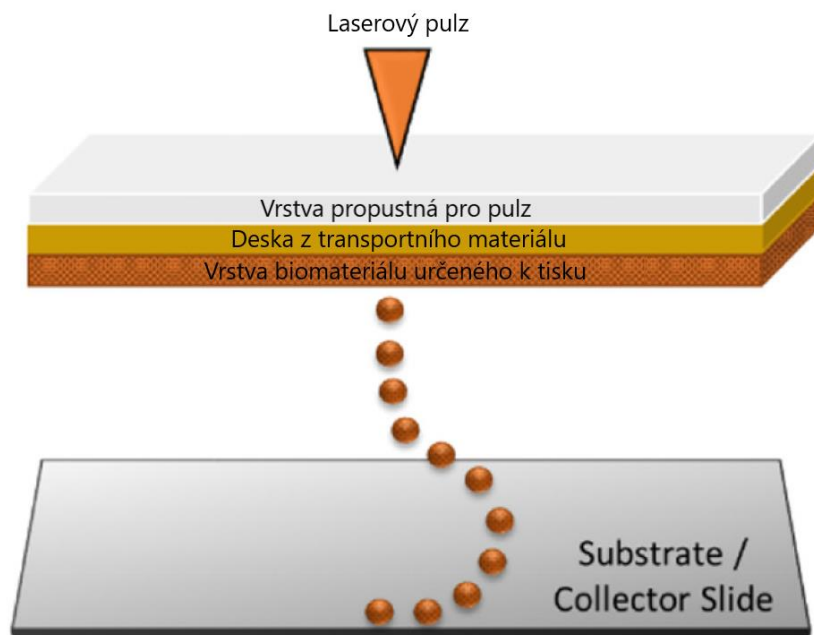
1.3.2 Biotisk založený na laseru

Biotisk založený na laseru lze rozdělit na dva typy: přímo laserem vedený biotisk a laserem-asistovaný biotisk. Při laserem vedeném biotisku paprsek laseru přímo přemísťuje buňky z původního místa na místa nové. Toto přemísťování je umožněno na základě rozdílného indexu lomu mezi buňkami a médiem ve kterém se nacházejí.



Obr. 1.2: Laserem vedený biotisk [15]

Laserem-asistovaný biotisk je bezkontaktní metoda, která byla původně vyvinuta pro výrobu mikročipů, v biologii používaná pro tvorbu peptidů, DNA a buněk. Aparatura pro tuto metodu biotisku se skládá z laseru, desky transportního materiálu, jako je zlato nebo titan, který je schopný přenést energii fotonů, a tisknutelného biomateriálu, naneseného na spodní straně desky. Laser, o zvolené vlnové délce, vyšle pulz na zadané místo desky z transportního materiálu, ta se v tomto místě zahřeje a vytvoří změnu tlaku, která vede k vypuzení biomateriálu v této oblasti, tato kapička je zachycena na platformě, kde vzniká požadovaná struktura. Hlavní výhodou této metody je vysoké rozlišení a absence trysky. Tím pádem je možno tisknout celou řadu biomateriálů, bez ohledu na jejich vlastnosti, dokud jsou schopny být vypuzeny energií poskytnutou laserem. Rozlišení tisku je závislé na typu laseru, vlastnostech biomateriálu a vzdálenosti desky od platformy. V rámci vlastností biomateriálu záleží na hydrofilních/hydrofobních vlastnostech a hustotě buněk. Největší nevýhodou této metody je cena, dlouhá časová náročnost přípravy desek a nutnost měnění desek při tisku velkých objemů, z důvodu docházení biomateriálu při jednom použití, [14].



Obr. 1.3: Laserem-asistovaný biotisk [15]

1.3.3 Extruzivní biotisk

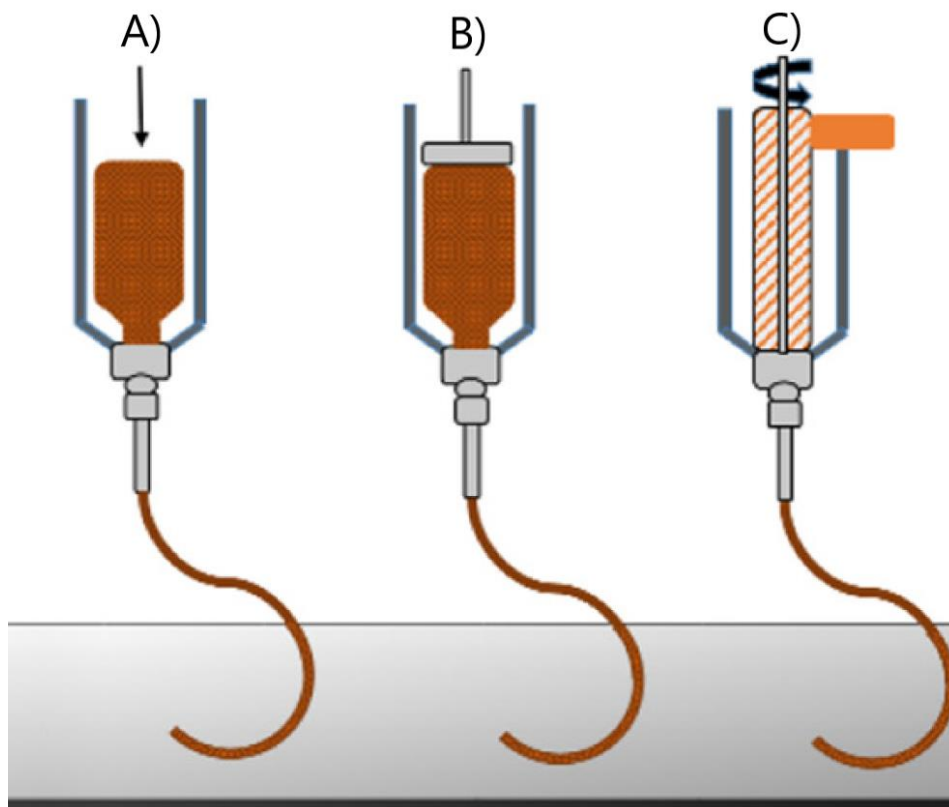
Extruzivní biotisk vychází z dnes nepoužívanější metody 3D tisku, tj. fused deposition modeling (FDM). Při FDM je plastové vlákno tryskou taveno a postupně, vrstvu po vrstvě, pokládáno na uživatelem určená místa. Extruzivní biotisk je úplně stejný, s tím rozdílem, že materiálem zde není plastové vlákno, ale biomateriál, nejčastěji hydrogel, a není jej třeba nějak tavit. Tato metoda je nejvíce využívána a je nejlevnější. Pomocí extruzivního biotisku lze tisknout hydrogely o viskozitách od 30 do $6 \cdot 10^7$ mPa s, [14]. Jelikož při tisku nevzniká skoro žádné teplo, tak je tato metoda jedna z nepoužívanějších u hydrogelů. Pohyb biomateriálu směrem k platformě, na kterou se tiskne, je zajištěn pneumatickou nebo mechanickou silou. Tyto metody jsou rozdílné nejen v použité síle, ale také ve svých výhodách a nevýhodách.

U pneumatických systémů je biomateriál tlačěn ven pomocí pístu, který vytváří nepřímý tlak na biomateriál. Nevýhodou je určité zpoždění celého systému, kdy vzniká prodleva mezi zvýšením tlaku a vytlačení biomateriálu. Výhodou je použití pro široké spektrum viskozit hydrogelů. Další výhodou je možnost umístění tohoto systému mimo tiskovou hlavu a tím zamezit artefaktům tisku spojeným s vibracemi.

Mechanické systémy lze dále rozdělit podle způsobu vytváření mechanické síly na šroubové a pístové. U šroubových mechanických systémů je mechanická síla

vytvořena pomocí šroubu, který je umístěn v tiskové hlavě. Výhoda při použití šroubu je zejména v jeho ovladatelnosti a funkčnosti. Nevýhodou je skutečnost že systém je schopen vytvářet vysoké tlaky v trysce, které mohou vést k usmrcení buňky. Tento problém lze minimalizovat použitím speciálních šroubů, určených pro biotisk. Posledním zmíněným systémem je pístový, kdy je biomateriál vytlačěn pístem. Jeho ovladatelnost je nižší než u šroubového systému, ale nevytváří tak vysoký tlak na buňky, což má za následek větší procento viabilních buněk, [6]. Nevýhodou obou mechanických systémů extruze je nutnost jejich umístění přímo v tiskové hlavě, což způsobuje přenos vibrací na trysku a vyšší namáhání motorků, sloužících k pohybu tiskové hlavy. Tyto nevýhody mohou mimo rozlišení tisku, ovlivnit celkový chod tiskárny.

Hlavní výhodou všech zmíněných systémů je rychlost tisku a celková využitelnost metody pro většinu hydrogelů, včetně termosenzitivních. Rozlišení metody je ve srovnání s ostatními metodami nižší – uvádí se až 100 μm , [13].



Obr. 1.4: A) Pneumatická extruze, B) Pístová extruze, C) Šroubová extruze [15]

1.4 Možnosti chlazení tiskové hlavy

Při tisku termolabilních hydrogelů je nutné některé biomateriály ochlazovat na požadovanou teplotu. Při této teplotě má hydrogel ideální vlastnosti pro tisk, které byly zmíněny výše a nevytváří síťové struktury, které by ovlivňovaly kvalitu tisku nebo mohly způsobit ucpání trysky. Chlazení by ideálně mělo chladit biomateriál

během celého tisku, ovšem po jeho vytisknutí by jej nemělo ovlivňovat. Dále je nutno aby chladicí prvek nezanášel do tisku artefakty, tyto artefakty by mohly být způsobeny například vibracemi, které by systém produkoval.

Při řešení toho problému se v podstatě nabízejí dvě možnosti chlazení a to: přímé chlazení, kdy je aktivní chladič umístěn přímo na tiskovou hlavu nebo nepřímé chlazení, kdy je aktivní chladič umístěn mimo tiskovou hlavu a ochlazování je uskutečněno nepřímo, přes chladicí médium.

1.4.1 Přímé chlazení tiskové hlavy

Jelikož je nutné chladit biomateriál na relativně nízké teploty, v případě Matrigelu až 4 °C. Je potřeba chladit tiskovou hlavu aktivně, to znamená, že nestačí pouze proud vzduchu o pokojové teplotě, ale je nutné použití aktivního prvku, který teplotu sníží pod teplotu okolí. Takovýmto nejčastěji využívaným prvkem je Peltierův článek.

Tento článek se skládá z matrice sériově a paralelně zapojených termočlánků. Jeden termočlánek se skládá z dvou polovodičů typu n a p, které představují vodiče, a měděného můstku, který tvoří jejich spoj. Tyto termočlánky jsou uzavřeny mezi dvojicí keramických desek. Keramické desky poskytují termoelektrickému článku pevnost a elektricky jej izolují od okolí. Peltierův článek funguje v podstatě jako tepelná pumpa, kdy při průchodu proudu odčerpáváme teplo. Teplá strana článku je však ohřívána jak absorbováním tepla ze studené strany, tak příkonem článku, [16].

Při přímém chlazení tiskové hlavy je Peltierův článek studenou stranou umístěn přímo na tiskovou hlavu. Tisková hlava musí být zhotovena z materiálu, který dobře vede teplo, aby byla tepelná výměna mezi studenou stranou Peltierova článku a tiskovou hlavou co nejefektivnější. Výhodou tohoto chlazení je jednoduchá regulace teploty na studené straně článku, kde výsledek chlazení je ovlivňován především velikostí protékajícího proudu Peltierovým článkem a teplotou horké strany. Nevýhoda tohoto řešení vyplývá z funkce Peltierova článku, kde teplota studené strany je závislá na protékajícím proudu a teplotě teplé strany, protože velikost protékajícího proudu přímo ovlivňuje ΔT , což je rozdíl teplot mezi teplou a studenou stranou článku. Proto je třeba teplou stranu Peltierova článku neustále ochlazovat pomocí chladičů, tyto chladiče mají velké rozměry a hmotnost. Při umístění takového zařízení na tiskovou hlavu jsou motory pohybující tiskovou hlavou zatěžována mnohonásobně více než bylo zamýšleno a hrozí jejich poškození. Další nevýhodou související s hmotností tiskové hlavy je celkové zpomalení tisku.

1.4.2 Nepřímé chlazení tiskové hlavy

Oproti přímému chlazení tiskové hlavy, je aktivní chladicí prvek umístěn mimo tiskovou hlavu a tisková hlava je chlazená nepřímo, přes chladicí médium. Chladicím médiem může být plyn nebo kapalina.

Při použití plynu jako chladicího média je plyn ochlazován mimo tiskovou hlavu a následně je např. systémem hadic přiváděn do kontaktu s tiskovou hlavou. Výhoda chlazení pomocí plynu je jeho hmotnost. Při takovémto chlazení téměř nevznikají vibrace, které by mohly negativně ovlivnit výsledek tisku. Dále tisková hlava s takovýmto chladicím médiem neváží víc než klasická tisková hlava a motory tiskárny jsou zatěžovány minimálně oproti klasickému použití. Nevýhodou plynu jako chladicího média je jeho tepelná kapacita, která má za následek nerovnoměrné ochlazení tiskové hlavy, a složitost aparatury důležité pro tento typ chlazení.

Druhou možností nepřímého chlazení je použití kapaliny jako chladicího média. Chladicí médium je, stejně jako v případě nepřímého chlazení s plynem, ochlazováno mimo tiskovou hlavu a následně přiváděno do kontaktu s tiskovou hlavou. Výhodou oproti nepřímému chlazení s plynem je lepší tepelná kapacita chladicího média a aparatura není tak komplikovaná. Nevýhodou použití kapaliny je možnost turbulentního proudění kapaliny v tiskové hlavě, které způsobuje vibrace ovlivňující kvalitu tisku.

1.5 Vybavení pro 3D biotisk termolabilních hydrogelů

V následující kapitole bude popsáno mnou navržené ideální vybavení pro 3D tisk termosenzitivních hydrogelů. Při návrhu vybavení budu vycházet ze znalostí získaných během studia problematiky 3D biotisku a termosenzitivních hydrogelů.

1.5.1 Extruzivní biotisk

Jako ideální modalitu pro 3D biotisk termosenzitivních hydrogelů považuji extruzivní biotisk. Jeho hlavní výhody tkví v ceně tisku, jednoduché úpravě jednotlivých částí systému a jelikož není potřeba při tisku zahřívat žádnou část systému, jak je tomu například u Tepelného injekt tisku, a při tisku nevzniká žádné teplo, je tato metoda ideální pro tisk materiálů, které jsou na teplotě závislé. Další obrovskou výhodou této metody je možnost tisknout velké objemy, ve srovnání s ostatními modalitami. Jelikož lze tisknout široké spektrum materiálů, tak se dá využít také hybridního tisku, kde se tisknou zároveň dva materiály, přičemž jeden z materiálů plní funkci podpor a vytváří mechanickou pevnost, zatímco druhý materiál obsahuje buňkami osázený hydrogel. Využitím této skutečnosti lze zvýšit jak rychlost tisku, tak viabilitu. Jedná se také o metodu s nejjednodušší přípravou pro tisk a údržbou.

1.5.2 Systém extruze

Nejvhodnější systém extruze pro tento typ hydrogelů je pístový. Největšími výhodami tohoto systému je jeho přesnost, možnost tisknout hydrogely o širokém spektru viskozit a rychlost tisku. Navíc oproti extruzi pomocí šroubu nabízí možnost zpětného chodu. Tuto funkci lze využít na nasávání biomateriálu, nebo k minimalizaci setrvačného vytlačení biomateriálu, po zastavení tiskové procedury. Tento systém nevytváří tak vysoké tlaky v oblasti trysky a je oproti šroubovému šetrnější, což má za následek větší procento viabilních buněk.

1.5.3 Platforma biotisku

Platforma, na kterou se tiskne, by měla být schopná udržet nastavenou teplotu, nejčastěji se jedná o fyziologickou teplotu 37 °C a je to teplota při které materiál síťuje. Tato teplota je důležitá pro mechanickou pevnost tkáně. Ve většině případů se výsledný produkt tiskne in vitro, ovšem lze tisknout i in vivo, to v dnešní době, ale pouze okrajově.

1.5.4 Inkubátor biotisku

Celá sestava by ideálně měla být umístěna ve sterilním prostředí s regulací teploty a proudem čistého vzduchu, který je hnán do inkubátoru přes bakteriální filtry. Při umístění tiskárny mimo inkubátor hrozí kontaminace a následná ztráta biokompatibility produktu. Tato konfigurace je vhodná pro tisk menších buněčných struktur s průběhem tisku do 60 minut, jelikož pak může docházet ke snížení buněčné viability vlivem nedostatku živit a CO₂.

1.5.5 Chlazení tiskové hlavy

Nejvhodnějším typem chlazení je chlazení nepřímé s kapalinou jako chladicí médium. Výhoda tohoto řešení je možnost umístění systému mimo tiskovou hlavu a minimální zátěže motorů tiskové hlavy, další výhodou je rovnoměrné ochlazení celého objemu tiskové hlavy. Nevýhodou tohoto řešení je možnost vzniku turbulentního proudění v tiskové hlavě, toto proudění by mohlo způsobit vibrování tiskové, které má za následek zhoršení prostorového rozlišení. Toto turbulentní proudění lze omezit kvalitním návrhem tiskové hlavy.

1.6 Cíle práce

Cílem mé práce je vhodně modifikovat 3D biotiskárnu GeSim-BioScaffolder k tisku termolabilních hydrogelů. Tiskárna využívá extruzivní technologie tisku, přesněji pneumatického extruzivního tisku. V současné době je tiskárna schopna tisknout dva rozdílné materiály, ale pouze při teplotě rovnající se teplotě okolí nebo vyšší.

Aby byla tato tiskárna schopna tisku termolabilních hydrogelů s požadovaným rozlišením, je nutné tiskovou hlavu, a tím i hydrogel, ochlazovat na dostatečně nízkou teplotu. Regulace teploty musí být dostatečně přesná, aby byl tisk kvalitní a reprodukovatelný.

2 PRAKTICKÁ ČÁST STUDENSTKÉ PRÁCE

Modifikace tiskové hlavy pro tisk termolabilních hydrogelů

Celé řešení tiskové hlavy bylo rozděleno na 3 části, které jsou: systém extruze, insert tiskové hlavy a chladicí okruh. Navazuji na projekt, který byl již z části realizován v části systému extruze. V této práci se věnuji realizaci insertu tiskové hlavy a chladicímu okruhu. Práce byla uskutečněna na Ústavu histologie a embryologie, Lékařské fakulty, Masarykovy univerzity.

2.1 Insert tiskové hlavy

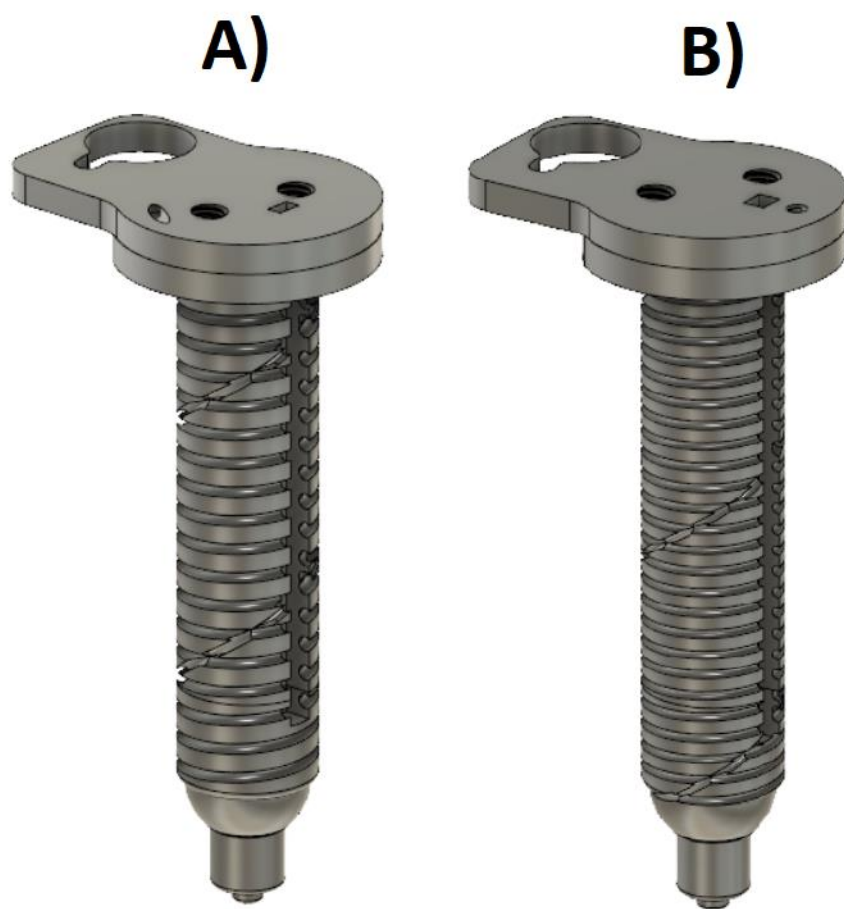
Pro nadstavbu pomocí insertu jsem se rozhodl, protože biomateriál je nutné ochlazovat až do chvíle, než je natisknut na podložku a takovéto řešení bylo jediné možné pro splnění této podmínky. Navíc ve většině případů jsou tisknuty pouze malé objemy a celkový obsah tiskové hlavy nebyl plně využit.

Při návrhu insertu jsem vycházel z rozměrů vnitřní části tiskové hlavy a zadaných požadavků. V programu Fusion 360 jsem navrhl 2 modely insertů, které jsou rozdílné pouze ve velikosti trysky, proto budu popisovat oba inserty zároveň.

Tělo insertu má tvar válce s dvojitou spirálovou drážkou, do které je zasazená hadička s hydrogelem, tato drážka je dostatečně hluboká na to, aby hadička v ní samovolně držela a manipulace byla co nejjednodušší. Drážka ve spodní straně insertu pokračuje do těla insertu a vystupuje v místě „Luer locku“, kde je našroubována vhodná tryska. V insertu je obdélníková drážka, do které je umístěno teplotní čidlo, které měří teplotu okolí a tím i hydrogelu. Celé tělo je duté a rozděleno přepážkou, kde proudí chladicí médium. Dno této dutiny je uzpůsobeno tak, aby médium v celém insertu proudilo co nejvíce laminárně. Vrchní část insertu slouží k upevnění v tiskové hlavě. Také se zde nachází 2 otvory se závitem, pro našroubování příslušného fittingu, v nichž jsou upevněny hadice, kterými proudí chladicí médium do insertu a ven. Zbývající otvory jsou pro teplotní čidlo a hadičku s biomateriálem, která pokračuje do systému zajišťujícího extruzi.

Tiskárna GeSim-BioScaffolder má dvě totožné tiskové hlavy, tudíž je možné umístit stejný insert do obou hlav a tisknout zároveň 2 rozdílné materiály.

Jelikož klasická 3D tiskárna s technologií FDM nemá potřebné rozlišení pro výtisk takového modelu, bylo nutné jej vytisknout na tiskárně s technologií SLA (stereolitografie).



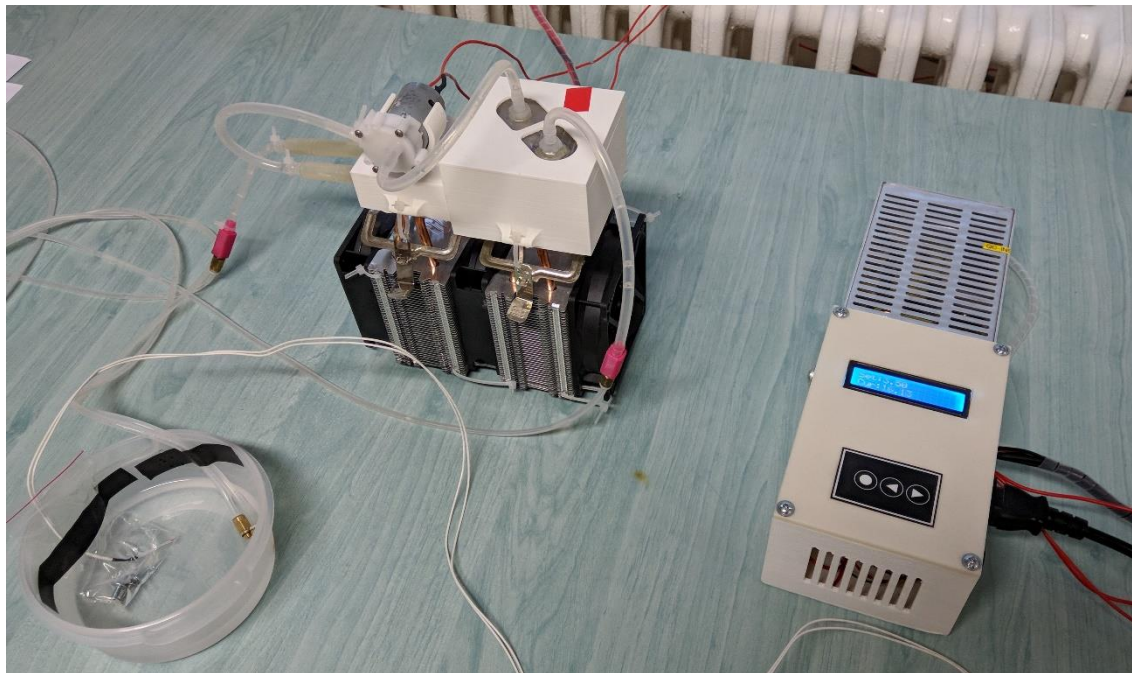
Obr. 2.1: A) Insert pro hadičku s vnějším průměrem 1,98 mm, B) Insert pro hadičku s vnějším průměrem 1,27 mm

2.2 Chladicí okruh

Druhou částí chlazení tiskové hlavy je chladicí okruh. Ten se skládá z elektrického obvodu a příslušného programu pro řízení teploty, Peltierových článků, CPU chladičů, větráků, chladících bloků, pumpy a systému hadic. Celý návrh je obohacen o prvky, které jsem navrhl a vytiskl na 3D tiskárně.

Při připojení Peltierova článku na stejnosměrné napětí je teplo převáděno z jedné strany na druhou a tím je vytvořen teplotní rozdíl mezi oběma stranami. Tohoto efektu jsem se rozhodl využít pro chlazení chladící jednotky, respektive média v ní proudícího. Jelikož je článek schopen v závislosti na velikosti protékajícího proudu vytvořit pouze teplotní rozdíl na stranách, je třeba jeho horkou stranu ochlazovat, aby na studené byla teplota dostatečně nízká. K tomuto chlazení jsem se rozhodl využít CPU chladič, který teplo z jeho horké strany odjímá. Na studené straně Peltierova článku je umístěn chladící blok. Jak je zřejmé z Obr. 2.2 chladící bloky nejsou totožné, větší, ze dvou chladících bloků, slouží současně jako

rezervoár chladicí kapaliny. Druhý blok má znatelně menší objem, ovšem tepelná výměna v tomto bloku je mnohem účinnější.

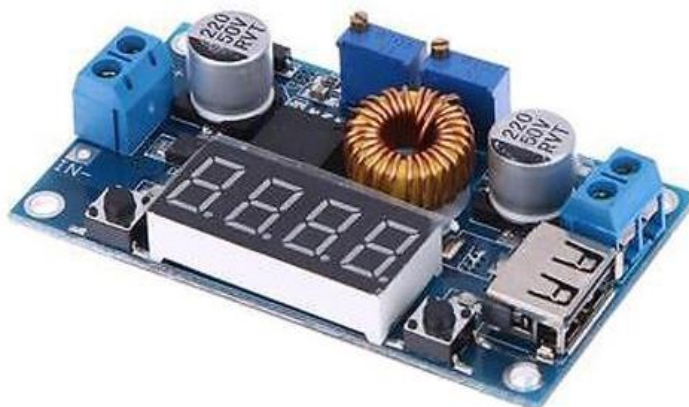


Obr. 2.2: Chladicí okruh

2.2.1 Elektronická část chladicího okruhu

Elektronická část chladicího okruhu se dělí na tři části. První část se skládá z pumpy a step-down měniče stejnosměrného napětí (Obr. 2.3), druhou částí jsou Peltierovy články a obvod pro jejich řízení a třetí částí jsou DC ventilátory sloužící k ochlazování CPU chladičů.

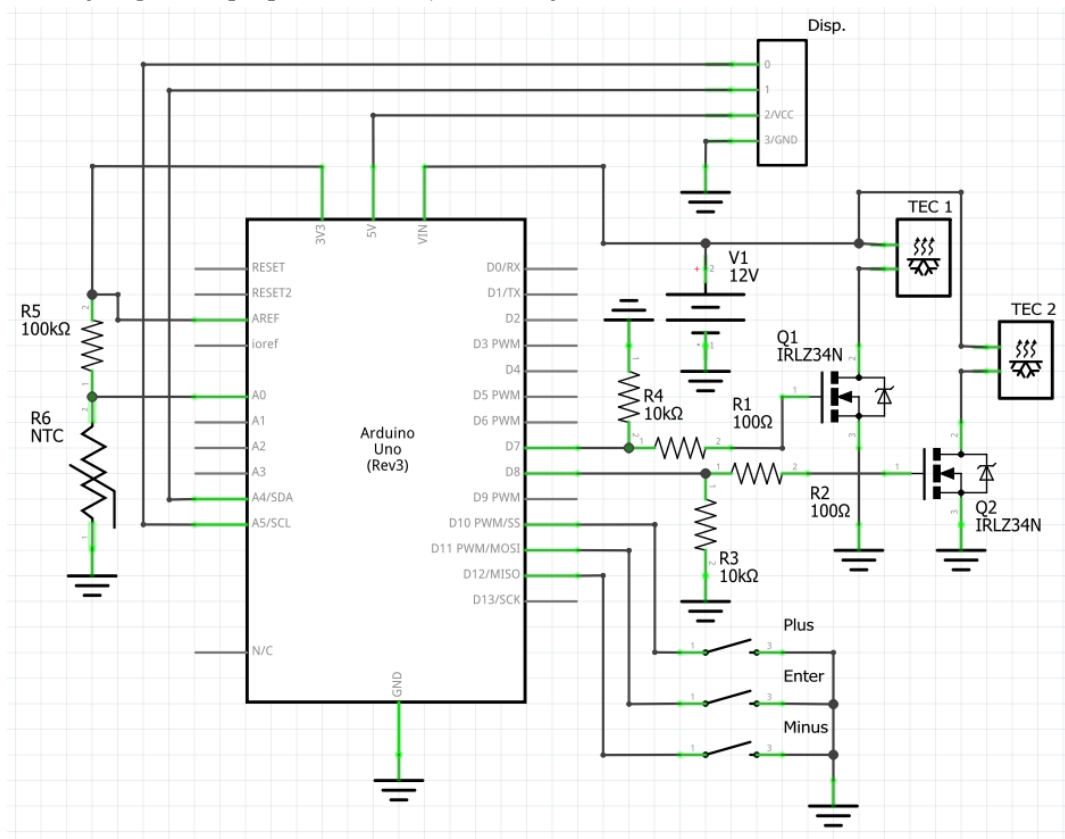
Vodní čerpadlo funguje v rozmezí 3-12 V stejnosměrného napětí, proud protékající čerpadlem je závislý na hydraulickém odporu. Pro jednoduchou modifikaci napětí na čerpadle jsem zvolil step-down modul (Obr. 2.3), na kterém lze upravovat hodnotu výstupního napětí pomocí trimru. Maximální hodnota výstupního proudu pro tento modul je 5 A, tato hodnota výstupního proudu je dostačující pro mnou zvolené čerpadlo. Dále modul obsahuje zabudovaný display, na kterém lze zobrazovat hodnoty výstupního napětí nebo proudu. Výhodou tohoto modulu je snadná úprava výstupního napětí, tím pádem se dají jednoduše upravit otáčky čerpadla.



Obr. 2.3: Step-down DC/DC měnič

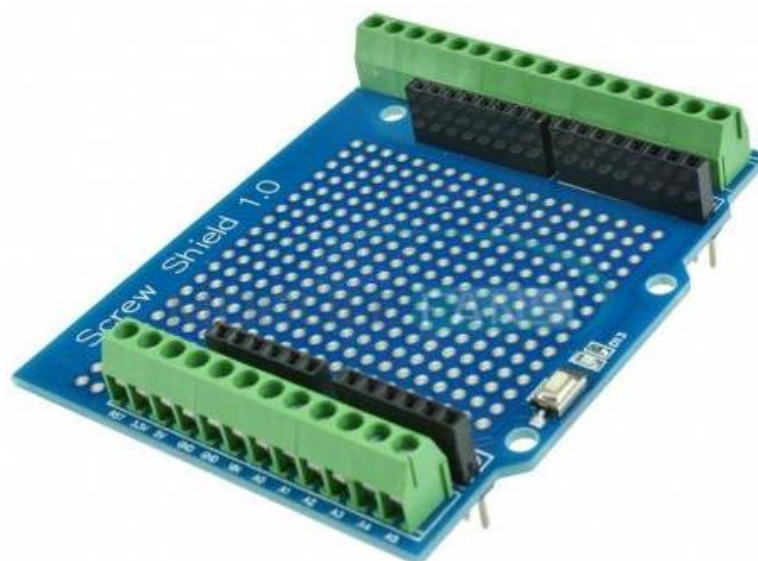
Na Obr. 2.4 je schéma elektronického obvodu pro řízení teploty. Hlavní částí obvodu je jednodeskový počítač Arduino Uno. Jako napájení tohoto jednodeskového počítače slouží 12 V zdroj. Na digitálních pinech 10 až 12 je připojena membránová klávesnice. Unipolární tranzistory IRLZ34N jsem vybral kvůli vhodným vlastnostem, zejména pak maximálnímu napětí mezi drain a source, maximálnímu drain proudu a threshold napětí, [17]. Gate unipolárních tranzistorů je spojen přes odpory R1 a R2, jejich hodnoty jsou $100\ \Omega$ a slouží k omezení překmitu v obvodu, s digitálními piny 7 a 8. Digitální piny 7 a 8 jsou přes odpory R3 a R4, jejichž hodnota je $10\text{k}\ \Omega$, spojeny se zemí. Tyto rezistory plní funkci pull-down rezistorů. Source unipolárních tranzistorů je spojen se zemí napěťového zdroje/Arduino. Studená strana Peltierových článků (na Obr. 2.4 označené jako TEC 1 a TEC 2) je spojena s drain unipolárních tranzistorů. Horká strana je připojena na kladný pól napěťového zdroje. Pokud není přivedeno žádné napětí na tranzistor z digitálního pinu je tranzistor rozepnutý a Peltierovými články neteče žádný proud. Jestliže je na tranzistor přivedeno napětí, které je vyšší než prahové, tak tranzistor sepne a uzavře obvod, potom Peltierovými články teče proud. Analogový pin 0 je připojen na dělič napětí jehož součástí je referenční odpor R5, tento odpor je zvolen tak, aby měl stejnou hodnotu odporu jako NTC termistor při teplotě $25\ ^\circ\text{C}$, a termistor typu NTC. Jako vstupní napětí tohoto děliče jsem zvolil 3.3 V, zvolil jsem nižší ze dvou hodnot, aby obvodem protékal menší proud. Proud protékající termistorem jej současně zahřívá a vyšší hodnoty proudu by mohly ovlivnit výsledné hodnoty. Analogový pin je zde ve formě INPUT a Arduino z něj pouze odečítá hodnoty napětí. Toto napětí se bude měnit v závislosti na změně odporu NTC termistoru, jehož odpor se bude měnit v závislosti na jeho teplotě, přičemž odpor bude se zvyšující se teplotou klesat. Pro připojení displeje jsem zvolil modul s integrovaným obvodem PCF8574, který funguje jako 8 bitový převodník na I2C sběrnici. Tento modul mi umožnil značně redukovat množství vodičů nutné k připojení k Arduino, protože sběrnice I2C používá pro komunikaci pouze dva signálové vodiče a to SDA (serial data) sloužící

k přenosu dat oběma směry a SCL (serial clock) který posílá všem slave zařízením hodinový signál, v případě I2C se jedná o synchronní komunikaci.



Obr. 2.4: Schéma zapojení pro řízení teploty

Tento obvod jsem nejprve zapojil na nepájivém poli, abych ověřil jeho funkčnost. Poté jsem celý obvod napájel na Screw Shield 1.0 (Obr. 2.5), který jsem po připojení všech periférií nasadil na Arduino Uno. Tento modul jsem zvolil, abych redukoval celkovou velikost zařízení a zajistil stabilní funkčnost.



Obr. 2.5: Modul Screw Shield 1.0

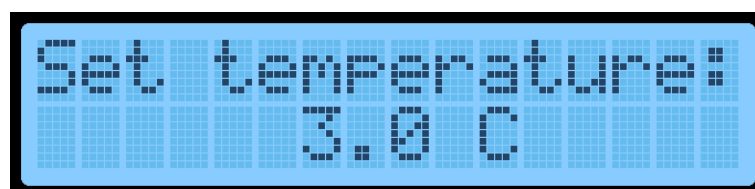
Jako ventilátory jsem vybral SUNON EE92251S1-A99, protože jejich napájecí napětí odpovídalo napětí mého zdroje. Dále jejich velikost byla přesně odpovídající velikosti CPU chladičů.

2.2.2 Program pro řízení teploty

Program jsem navrhoval ve vývojovém prostředí Arduino IDE a při práci jsem používal několik knihoven, například pro lehčí práci s displejem nebo EEPROM pamětí.

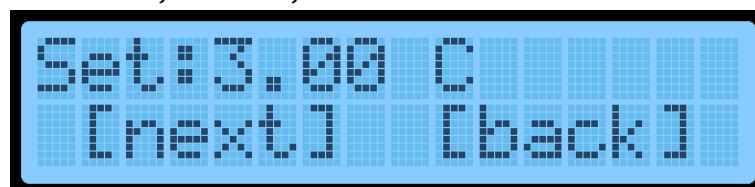
Piny sloužící pro spínání unipolárních tranzistorů jsou výstupní. Piny, na kterých je připojena klávesnice nebo termistor jsou vstupní. K nastavování požadované teploty slouží jednoduché čtyř stupňové menu, kde se uživatel pohybuje pomocí membránové klávesnice.

První stupeň (Obr. 2.6) slouží k nastavování teploty. Zde si uživatel pomocí membránové klávesnice nastaví požadovanou teplotu s přesností na jedno desetinné místo.



Obr. 2.6: První stupeň menu

Další stupeň slouží pouze k potvrzení předešlého nastavení. Vybraná možnost je zobrazována jako blikající.



Obr. 2.7: Druhý stupeň menu

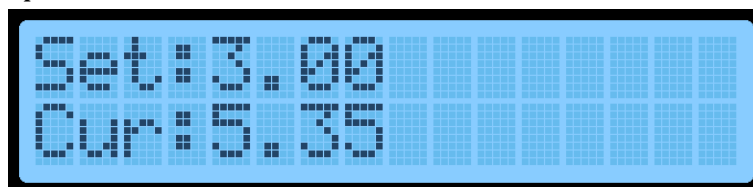
Ve třetím stupni je zobrazována pouze nastavená teplota a aktuální teplota čidla. V této části taky funguje spínání unipolárních tranzistorů. Aktuální hodnota napětí na čidle je odečítána každé 2 sekundy. Z této hodnoty napětí je dále dopočítána teplota. Teplota NTC termistoru se dá spočítat pomocí Steinhartova-Hartova vztahu (2.1).

$$\frac{1}{T} = A + B \ln \frac{R}{R_0} + C \ln^2 \frac{R}{R_0} + D \ln^3 \frac{R}{R_0} \quad (2.1)$$

Kde T je teplota v Kelvinech, R_0 je referenční odpor, R je aktuální hodnota odporu a koeficienty A, B, C a D upravují strmost průběhu podle typu termistoru, tyto koeficienty jdou jednoduše dohledat v dokumentaci k určitému termistoru. Pokud je v dokumentaci k termistoru uveden pouze tzv. beta faktor je výše zmíněná rovnice upravena do tohoto tvaru:

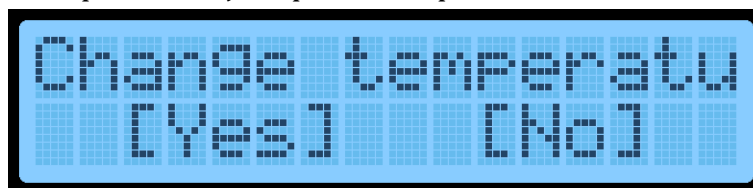
$$\frac{1}{T} = \frac{1}{T_0} + \frac{1}{B} \ln \frac{R}{R_0} \quad (2.2)$$

Kde T_0 odpovídá teplotě při, které má termistor hodnotu referenčního odporu R_0 a B je beta faktor. Vypočtená teplota je uložena do vektoru spolu s předešlými 4 hodnotami a je vypočítán průměr z těchto teplot. Tento průměr je zobrazen na displeji jako aktuální teplota čidla, dále je aktuální teplota porovnána s nastavenou a pokud je vyšší, než ona nastavená teplota je vyslán signál z Arduina který otevře unipolární tranzistory a Peltierovými články začne protékat proud, který způsobí teplotní rozdíl na jeho stranách, který je využíván k ochlazování chladících bloků a média v nich proudících.



Obr. 2.8: Třetí stupeň menu

Poslední stupeň slouží jako potvrzení, pokud chce uživatel změnit teplotu.



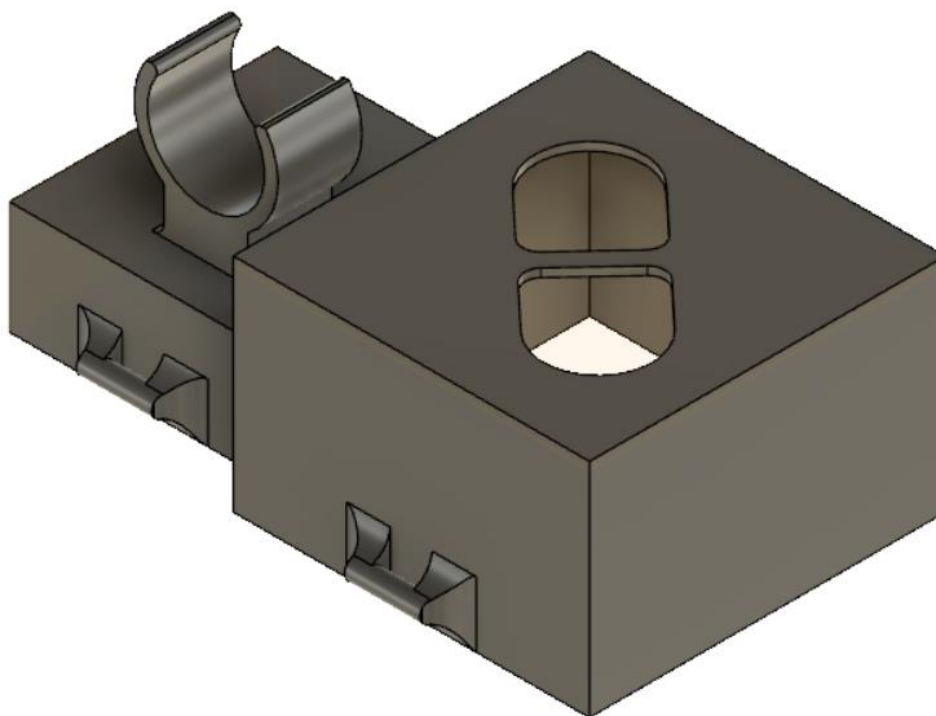
Obr. 2.9: Čtvrtý stupeň

Hodnota nastavené teploty a pozice v menu je ukládána do EEPROM paměti. Tudíž i po vypnutí, zůstane zařízení v tom menu, ve kterém bylo před vypnutím a nastavená teplota je znovu načtena. Díky tomuto menu a uchovávání hodnot je práce s přístrojem velice jednoduchá a intuitivní.

2.2.3 3D modely

Dále jsem navrhl a vytiskl na své tiskárně izolační kryt chladících bloků, skříňku pro veškerou elektroniku a spojku která umožňuje redukci z vnitřního průměru hadice 4 mm na 2 mm vnitřního průměru hadice. Všechny modely jsem navrhl v programu Fusion 360 a vytiskl na 3D tiskárně Creality ENDER 3.

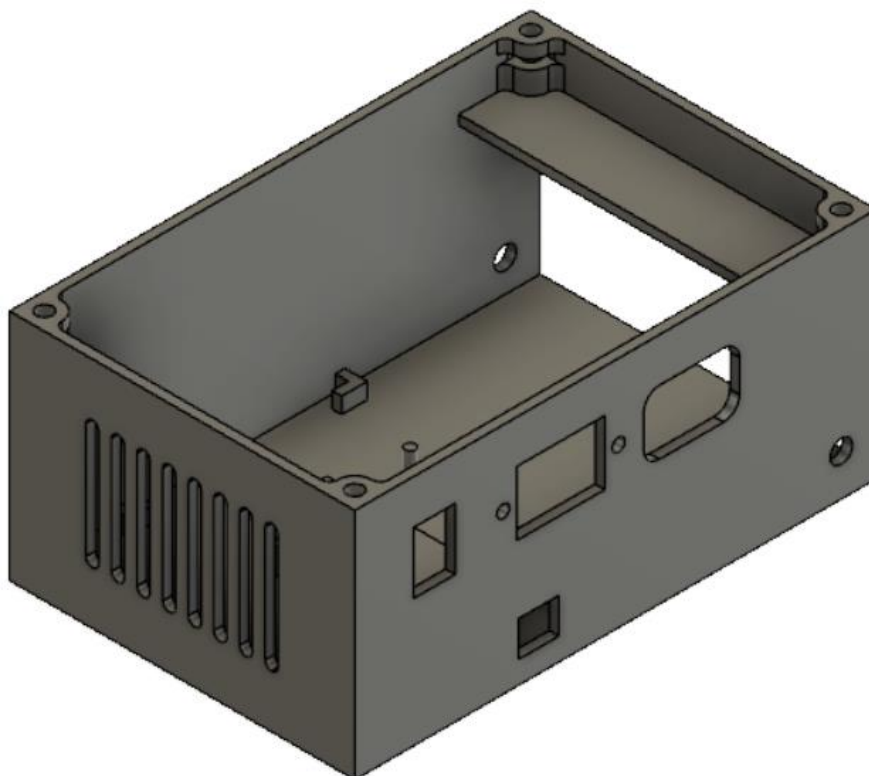
Na Obr. 2.10 je model izolačního krytu chladících bloků. Kryt slouží k izolaci a zároveň k upevnění bloků na svém místě. Kryt jsem navrhoval podle rozložení bloků na CPU chladičích, přičemž kolem jednotlivých bloků jsem vytvořil 10 mm mezeru do které přidán izolační materiál. Kryt je připevněn k CPU chladičům pomocí stahovací pásky, ty zajistí pevnost celé konstrukce a minimální pohyb chladících bloků. Dále jsem na krytu vymodeloval držák, ve kterém je umístěno vodní čerpadlo.



Obr. 2.10: Kryt chladících bloků

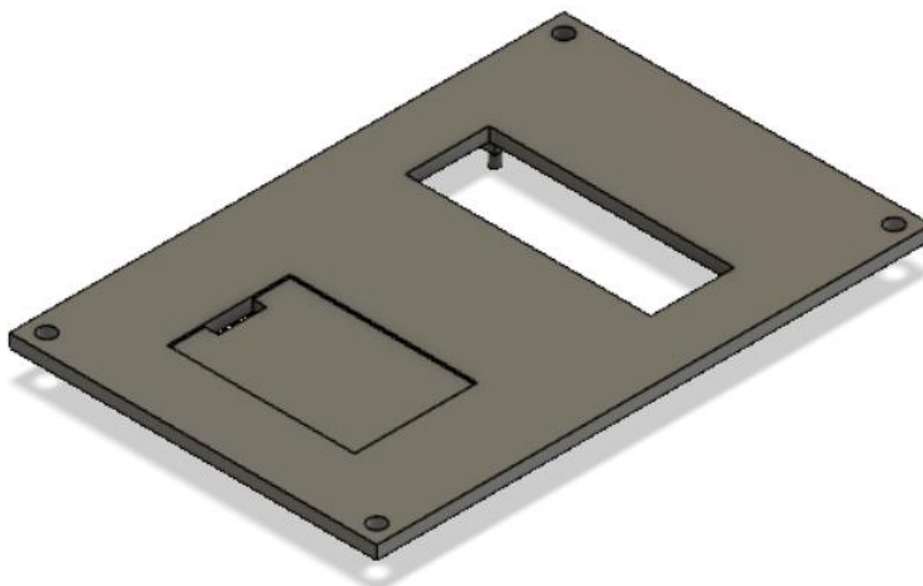
Dále jsem vymodeloval skříňku pro veškerou elektroniku, která se skládá ze dvou kusů. Při návrhu jsem se zaměřil na to, aby byla skříňka přímo připojitelná k 12 V zdroji, který slouží jako napěťový zdroj pro celý systém.

První část skříňky (Obr. 2.11) je hlavní konstrukce, která je dále nasunuta na zdroj napětí a upevněna dvěma šrouby. Na čelní straně skříňky jsou otvory sloužící pro samovolné proudění vzduchu. Na dnu skříňky jsou výstupky sloužící pro zasunutí DC/DC step-down měniče, dále jsou na dnu výstupky, do kterých je nasunuto Arduino UNO, ty zde plní stejnou funkci jako výstupky pro DC/DC step-down měnič, a to upevnění prvků na svém místě. Dále se na jedné straně nachází otvory pro kolébkový 2-pólový spínač, který slouží pro jednoduché zapnutí a vypnutí zdroje, napájecí EURO konektor, ten je zde pro možnost odpojení napájecího kabelu, USB-B port, který slouží pro připojení Arduina k počítači, díky tomu je možná jednoduchá úprava kódu, bez nutnosti vytahovat Arduino ze skříňky, a otvor pro zbývající kabely, které vedou k chladicímu okruhu. Ve všech rozích se nachází otvor pro šroubky, sloužící k pevnému spojení obou částí skříňky.



Obr. 2.11: První část skříňky na elektroniku

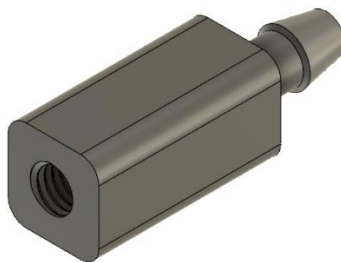
Na druhé části skříňky (Obr. 2.12), která slouží jako víko, se nachází otvor pro displej a klávesnici. Displej na víku drží díky přesnému návrhu, ovšem pro zajištění pevnosti je ještě navíc přilepený k víku lepidlem. Membránová klávesnice má samolepící povrch, díky němuž drží na svém místě. Ve všech rozích je otvor pro šroubek, jímž jsou obě části krytu pevně spojeny.



Obr. 2.12: Druhá část skříňky na elektroniku

Na Obr. 2.13 je model spojky pro redukci hadice z vnitřního průměru 4 mm na 2 mm. Na jedné straně je mechanismus pro nasunutí hadice, zatímco druhé je

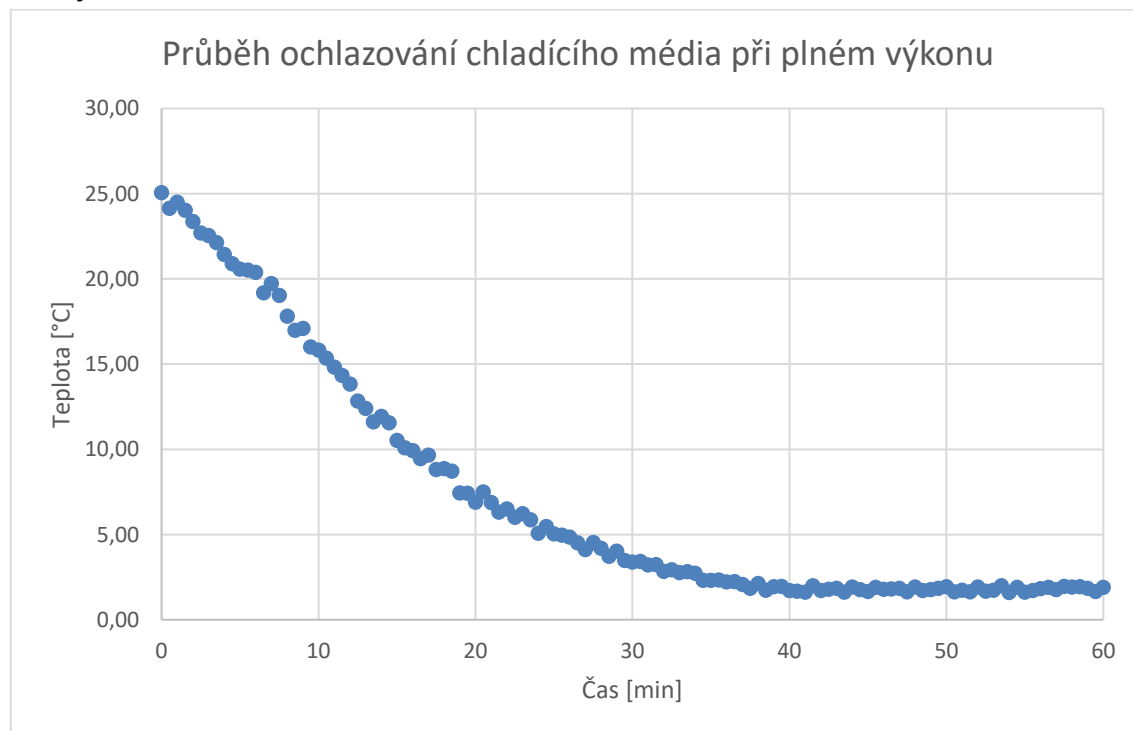
závit, do kterého je našroubována rychlospojka pro hadice s vnějším průměrem 4 mm, totožná rychlospojka je našroubovaná v insertu tiskové hlavy.



Obr. 2.13: Redukce hadic

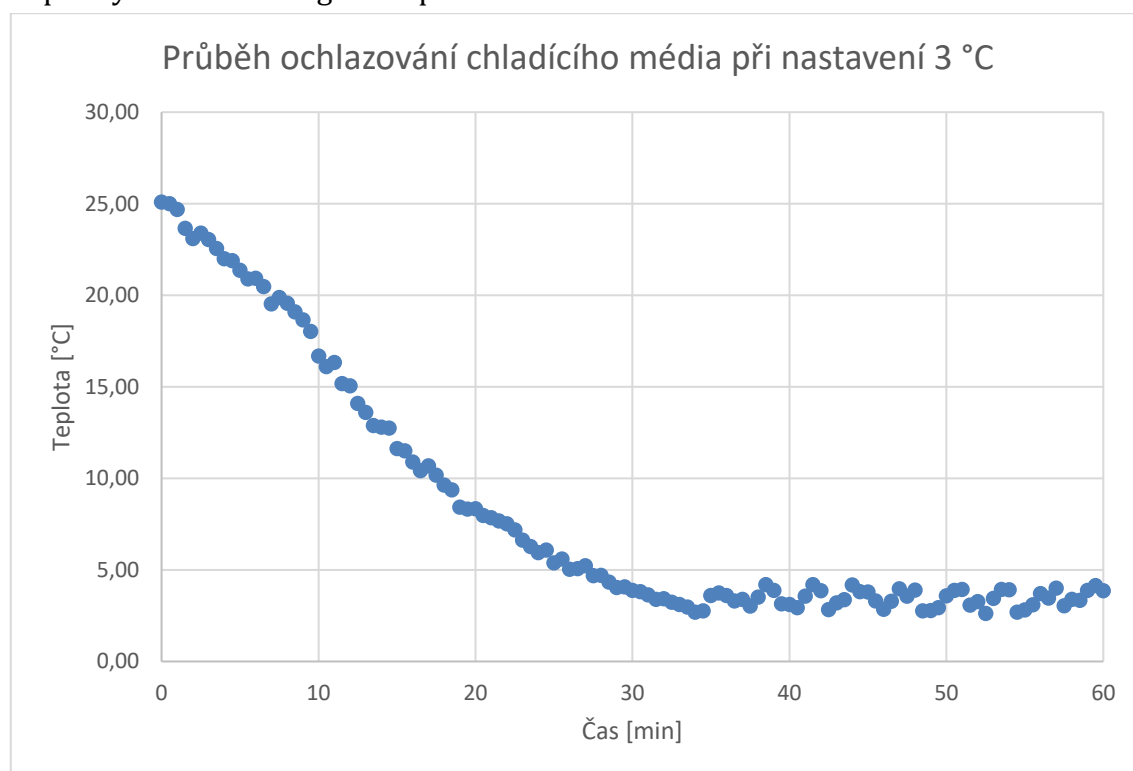
2.2.4 Výsledek chlazení

Po sestavení celého okruhu jsem uskutečnil kontrolní měření. Jedno měření bylo při nastavení velice nízké teploty, tak aby ji systém nebyl schopný dosáhnout. Měření jsem prováděl při minimálním napětí na vodním čerpadlu (3 V), toto napětí jsem nastavil, protože nižší otáčky pumpy budou mít menší vliv na tiskovou hlavu a nebudou zanášet artefakty do tisku, které by mohly být spojeny s vibracemi pumpy. V nádobě jsem každou půl minutu měřil teplotu chladicího média, v mém případě to byla voda. Naměřené hodnoty jsem zpracoval do grafu na Obr. 2.14. Teplota s přibývajícím časem klesala, přičemž kolem 36 minut se teplota ustálila na hodnotě blízké se 1,8 °C. Na této teplotě se hodnota ustálila a kolísala pouze s malou odchylkou $\pm 0,1$ °C.



Obr. 2.14: Průběh ochlazování chladicího média při plném výkonu

Ve druhém měření jsem nastavil teplotu na hodnotu nižší než 8 stupňů, která je vhodná pro tisk materiálů, které s narůstající teplotou gelovatí. Zvolil jsem 3 °C, což je zároveň teplota vhodná pro testování zatížení a stálosti systému. Napětí na čerpadle bylo stejné jako v minulém měření, také měřící aparatura zůstala stejná (Obr. 2.2). Naměřené hodnoty jsem zpracoval do grafu na Obr. 2.15. Teplota, než dosáhla požadované hodnoty, s uplynulým časem klesala. Po dosažení nastavené teploty je možné sledovat v průběhu mírné oscilace, kolem nastavené teploty. Tyto oscilace ($\pm 0,9$ °C) jsou způsobeny dynamikou systému, zvláště ohřevem chladicí kapaliny v okruhu a regulací spínání.



Obr. 2.15: Průběh ochlazování chladicího média při nastavení 3 °C

2.3 Tisk více hydrogelů v jedné úloze

Tisková hlava biotiskárny GeSim–BioScaffolder (Obr. 2.16) obsahuje dvě samostatné tiskové hlavy a je schopná tisknout dva různé hydrogely najednou. Mnou navržená modifikace tiskárny pomocí insertu tiskové hlavy a chladicího okruhu zachovává možnost tisku dvou různých hydrogelů najednou, ovšem při tisku dvou termolabilních hydrogelů najednou je nutné zdvojení celého systému, to znamená vložení insertu do každé tiskové hlavy a připojení každé tiskové hlavy na svůj vlastní chladicí okruh. Toto řešení je vhodné zvláště při tisku dvou termolabilních hydrogelů s různými CST.

Druhá možnost řešení je připojení jednoho chladicího okruhu a propojení tiskových hlav. Při tomto řešení lze ovšem regulovat teplotu pouze jedné tiskové hlavy.



Obr. 2.16: Detail tiskové hlavy GeSim-BioScaffolder

2.4 Diskuze

Zadaným úkolem v této bakalářské práci bylo vytvořit rozšíření tiskové hlavy pro tisk termolabilních hydrogelů. Při řešení tohoto problému jsem se rozhodl pro nadstavbu současné tiskové hlavy pomocí insertu a přídavného chladicího okruhu.

Mnou navržené řešení se skládá z insertu a chladicího okruhu. Insert je přesně navržen na rozměry biotiskárny GeSim-BioScaffolder a pouze se jednoduše zasune do stávající tiskové hlavy. Chladicí médium je ochlazováno mimo zařízení GeSim-BioScaffolder a do insertu je přiváděno pomocí hadic. Díky tomuto řešení je do tisku zanášeno co nejméně artefaktů spojených se systémem chlazení. Zařízení obsahuje displej a membránovou klávesnici pro jednoduchou manipulaci s chladicím systémem. Minimální stabilní teplota, na kterou je schopné zařízení chladicí médium vychladit je 1,8 °C. Při nastavení teplot vyšších je zařízení schopné tuto teplotu s mírnými oscilacemi udržet. Teplota při ustálení kolísala mezi 2,6 °C a 4,4 °C.

Návrh lze obohatit o další stupeň chlazení a tím snížit minimální teplotu chlazení. Oscilace kolem nastavené teploty se dá omezit například přidáním PID regulace.

3 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem popsal důležité vlastnosti biomateriálů pro 3D biotisk. Dále jsem popsal nejčastěji využívané hydrogely pro 3D biotisk, se zaměřením na termolabilní. Vypracoval jsem literární rešerši nejčastěji využívaných modalit pro tisk 3D biotisk, možností chlazení tiskové hlavy a navrhnul ideální vybavení pro 3D biotisk termolabilních hydrogelů.

Praktická část se zabývala úpravou stávající tiskové hlavy GeSim-BioScaffolder na ústavu Ústavu histologie a embryologie Masarykovy univerzity. Zadaný problém jsem se rozhodl řešit modifikací stávající tiskové hlavy pomocí navrženého insertu a chladicího okruhu s možností řízení teploty. Při návrhu jsem se zaměřil na zachování současné možnosti použití dvou tiskových hlav při jedné tiskové úloze a jednoduchost ovládání celého systému. Konečné řešení jsem otestoval a zhodnotil výsledky.

Výsledné zařízení dosahuje dostačujících výsledků, možného zlepšení by se dalo dosáhnout lepším ustálením teplot nebo nižší minimální teplotou.

Literatura

- [1] SPEIGHT, James G. *Rules of thumb for petroleum engineers*. Beverly, MA: Scrivener Publishing, 2017. ISBN 9781118595268.
- [2] PARK, Jennifer S., Julia S. CHU, Anchi D. TSOU, Rokhaya DIOP, Zhenyu TANG, Aijun WANG a Song LI. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials* [online]. 2011, **32**(16), 3921-3930 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.019. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211001712>
- [3] JEONG, Byeongmoon, Sung Wan KIM a You Han BAE. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, **54**(1), 37-51 [cit. 2018-11-25]. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00242-3. ISSN 0169409X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X01002423>
- [4] CUI, Xiaofeng, Delphine DEAN, Zaverio M. RUGGERI a Thomas BOLAND. Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2010, **106**(6), 963-969 [cit. 2018-11-23]. DOI: 10.1002/bit.22762. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22762>
- [5] WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(20), 2941-2953 [cit. 2018-12-01]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002676>
- [6] ATALA, Anthony a James J. YOO. *Essentials of 3D biofabrication and translation*. Boston: Elsevier/Academic Press, [2015]. ISBN 978-0128009727.
- [7] ALBERTS, B., et al. Collagens are the Major Proteins of the Extracellular Matrix. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 1096.
- [8] WANG, Xiaohong, Qiang AO, Xiaohong TIAN, Jun FAN, Hao TONG, Weijian HOU a Shuling BAI. Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers* [online]. 2017, **9**(12) [cit. 2018-12-01]. DOI: 10.3390/polym9090401. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/9/9/401>
- [9] AHMED, Tamer A.E., Emma V. DARE a Max HINCKE. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2008, **14**(2), 199-215 [cit. 2018-12-10]. DOI: 10.1089/ten.teb.2007.0435. ISSN 1937-3368. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2007.0435>
- [10] HUGHES, Chris S., Lynne M. POSTOVIT a Gilles A. LAJOIE. Matrigel: A complex rotein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS* [online]. 2010, **10**(9), 1886-1890 [cit. 2018-12-10]. DOI:

- 10.1002/pmic.200900758. ISSN 16159853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900758>
- [11] SNYDER, J E, Q HAMID, C WANG, R CHANG, K EMAMI, H WU a W SUN. Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip. *Biofabrication* [online]. 2011, **3**(3) [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.1088/1758-5082/3/3/034112. ISSN 1758-5082. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/1758-5082/3/i=3/a=034112?key=crossref.0af97eafe9ded021d80c9f39687efb4b>
- [12] GIOFFREDI, Emilia, Monica BOFFITO, Stefano CALZONE, Sara Maria GIANNITELLI, Alberto RAINER, Marcella TROMBETTA, Pamela MOZETIC a Valeria CHIONO. Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications. *Procedia CIRP* [online]. 2016, **49**, 125-132 [cit. 2018-12-11]. DOI: 10.1016/j.procir.2015.11.001. ISSN 22128271. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212827115010628>
- [13] OZBOLAT, I. T. a YIN YU. Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 2013, **60**(3), 691-699 [cit. 2018-12-12]. DOI: 10.1109/TBME.2013.2243912. ISSN 0018-9294. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6423824/>
- [14] SUNTORNNOND, Ratima, Jia AN a Chee Kai CHUA. Bioprinting of Thermoresponsive Hydrogels for Next Generation Tissue Engineering: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2017, **302**(1) [cit. 2018-12-12]. DOI: 10.1002/mame.201600266. ISSN 14387492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mame.201600266>
- [15] VIJAYAVENKATARAMAN, Sanjairaj, Wei-Cheng YAN, Wen Feng LU, Chi-Hwa WANG a Jerry Ying Hsi FUH. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2018, **132**, 296-332 [cit. 2018-12-12]. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.004. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X18301686>
- [16] DISALVO, F. J. Thermoelectric Cooling and Power Generation. *Science* [online]. **285**(5428), 703-706 [cit. 2018-12-12]. DOI: 10.1126/science.285.5428.703. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5428.703>
- [17] International Rectifier Corp. [online]. IRLZ34N. 1997 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://www.irf.com/product-info/datasheets/data/irlz34n.pdf>

Seznam symbolů, veličin a značek

CST	–	Critical solution temperature
ECM	–	Extraceluární matrix
PEG	–	Poly(ethylen glycol)
FDM	–	Fused deposition modeling
SLA	–	Stereolitografie
SDA	–	Serial data signal
SCL	–	Serial clock

Seznam příloh

Datové přílohy (viz přiložené CD):

Příloha 1	–	Program pro řízení teploty
Příloha 2	–	Model insertu (1,98 mm)
Příloha 3	–	Model insertu (1,27 mm)
Příloha 4	–	Model krytu chladících bloků
Příloha 5	–	Model skříňky na elektroniku
Příloha 6	–	Model redukce hadic